

本邦で報告された3種類の変異型をそれぞれ有する3症例(Asp18Gly、Ala25Thr、Tyr114Cys)、および米国のleptomeningeal-type TTR アミロイドーシス家系(Val30Gly、Tyr69His)の症例。

② non-leptomeningeal-type :

Ala25Ser、Val30Leu、Val30Met、Asp38Ala、Ser50Arg、Thr60Ala、Tyr69Ile、Tyr114His の各変異 TTR を有する症例。

2. 方法

1) IP-Mass 分析法による FAP 患者の迅速診断

被検者の血清 20 μ l と抗ヒト TTR 抗体(DAKO) 10 μ l を混和し 4°C で一晩 incubate した後に、遠心して抗原抗体複合体を免疫沈降させ、MALDI/TOF 型質量分析計で解析した(IP-Mass 分析)。

2) 生化学的検討

① 対象患者の髄液 100 μ l、血清 20 μ l をそれぞれ IP-Mass 分析により解析した。得られた mass spectra から血清および髄液中の変異/正常 TTR の存在比について検討した。

② Tyr114Cys 患者および Val30Met 患者の血清および髄液中から、HiPrep Sephacryl S-200HR カラムを用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより TTR の tetramer および monomer fraction を分離して、これらの fraction 中に含まれる TTR について①と同様に IP-Mass 分析を行った。

3. 倫理面への配慮

被検者から血液あるいは髄液を採取するにあたっては、信州大学の倫理委員会で承認された方式に従って、実験の目的と方法の十分な説明を行い informed consent を得た後に検体の採取を実施した。

C. 研究結果

1. IP-Mass 分析法による FAP 患者の迅速診断

1999年以降117件、121例の被検者の診断依頼を受け、IP-Mass分析による迅速診断を行った(図1)。121例の診断内容は、正常例62例、Val30Met症例49例、非Val30Met症例10例(Ala25Ser、Ala25Thr、Val30Leu、Lys35Asn、Ser50Ile、Thr60Ala、Tyr69His、Ile107Val、Tyr114His、Tyr114Cys)であった。これらの非Val30Met症例のうちleptomeningeal-type TTRアミロイドーシス患者であるAla25ThrとTyr114Cys患者では血清のIP-Mass分析では変異TTRが検出できなかったため、変異TTRを持たな

い正常例と診断した。しかし後に沈着アミロイドがTTRであることが判明したのでPCR法とdirect sequencingによるTTR遺伝子の分析を行ったところ、Ala25ThrとTyr114Cysの変異がそれぞれ明らかになった。

2. leptomeningeal-type 患者体液中 TTR の生化学的分析

1) 血清及び髄液中 TTR の IP-Mass 分析

血清中 TTR の IP-Mass 分析では、今回検討した leptomeningeal-type 患者 5 例にはいずれも変異型のピークが認められなかったが、non-leptomeningeal-type ではすべての検討症例において正常型と変異型 TTR のピークが明瞭に検出された(図2)。一方、髄液中 TTR の IP-MASS 分析では、今回検討した leptomeningeal-type 患者である Asp18Gly、Ala25Thr および Tyr114Cys の 3 症例で血清中では認めなかった変異型 TTR のピークを髄液中にはわずかに認めた(図3)。mass spectrum でのピークの高さから計算した正常型 TTR に対する変異型 TTR の髄液中での存在比は、Asp18Gly、Ala25Thr および Tyr114Cys 症例でそれぞれ、 11.4 ± 0.6 、 23.3 ± 2.2 、 $22.4 \pm 1.5\%$ であった。non-leptomeningeal-type 症例では、同様に計算した正常型 TTR に対する変異型 TTR の存在比は 82.2-111.0%の範囲にあり、leptomeningeal-type では、non leptomeningeal-type と比較して変異型 TTR の比率が明らかに低下していた。

2) Tyr114Cys 患者および Val30Met 患者の血清および髄液中 TTR の tetramer および monomer fraction の分析

Tyr114Cys および Val30Met 患者の血清 1ml と髄液 5ml 中から、ゲルろ過クロマトグラフィーにより TTR の tetramer および monomer fraction を分離し、その IP-MASS 分析を行った。Leptomeningeal-type である Tyr114Cys 患者では、血清中の両 fraction と髄液中 tetramer fraction には変異型 TTR のピークを認めなかったが、髄液中の TTR monomer fraction には変異型 TTR のピークを認めた。non-leptomeningeal-type である Val30Met 患者では4種類の fraction いずれにも変異型の明瞭なピークを認めた(図4)。

D. 考察

IP-Mass分析によれば最短の場合1-2時間で被検者の血清中に変異TTRが存在するかどうかを判定することが可能であり、TTRアミロイドーシス患者の臨床診断においてきわめて有用な方法である。この方法では、正常TTRからのmass differenceが10 m/zになるような変異TTR(例えばGlu89Gln、Ile84Asnなど)は診断できないが、計算上全変異TTRの約90%は診断が可能であると考えられた。しかし、これまでの検討でleptomeningeal-type TTRアミロイドーシスであるAla25ThrとTyr114CysではIP-Mass分析で血清中からは変異TTRが検出できなかった。Ala25ThrとTyr114Cysにおける変異TTRの正常TTRからのmass differenceはそれぞれ+30と-60であるので、これらの変異TTRはIP-Mass分析で同定されるべき変異である。したがって以上のような実験結果からは、leptomeningeal-type TTRアミロイドーシスを生じるような変異TTRが、他の変異TTRとは異なる、特異な蛋白化学的性質を有することが推測された。そのような経緯から、次のleptomeningeal-type TTRアミロイドーシス患者における髄液中および血清中TTRの生化学的性質を検討する研究を開始した。

今回検討した leptomeningeal-type TTR アミロイドーシスをきたす5種類の変異型においては、血清中からは変異TTRが検出されず、一方髄液中からは、微量ながら変異TTRが検出された。この結果は、leptomeningeal-type TTRアミロイドーシスでは全身臓器よりも髄膜にアミロイド沈着の主座を有するという臨床所見とよく相応している。また leptomeningeal-type TTRアミロイドーシス症例では、髄液中TTRのtetramer fractionには変異TTRが検出されず、monomer fractionには変異TTRが存在した。このことは、leptomeningeal-type TTRアミロイドーシスにおいては、変異TTRがtetramer形成に参加できずに不安定なmonomerとして存在していることを示している。TTR分子中にはその高次構造の維持にとって重要なアミノ酸残基が存在することが知られており、特定の部位のアミノ酸残基に特定の変異が生じた際には、tetramerが形成できずに不安定なmonomerでしか存在できない特異な蛋白化学的性質を有する変異TTRが産生され、このようなTTRがleptomeningeal-type TTR

アミロイドーシスという特異な表現型の発現に関与していると考えられた。

E. 結論

- 1) 血清中TTRのIP-MASS分析はTTRアミロイドーシス患者の臨床診断に有用であるが、変異TTRの正常TTRからのmass differenceが小さい場合に加えて、leptomeningeal-type TTRアミロイドーシスをきたすような変異TTRは検出できない。
- 2) leptomeningeal-type TTRアミロイドーシスの発症機序として、このような臨床症状を発現する変異TTRが、TTR分子のtetramer形成に参加できずに不安定なmonomerとして存在するという変異TTRの物性が重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Yazaki M, Fushimi T, Tokuda T, Kametani F, Yamamoto K, Matsuda M, Shimojo H, Hoshii Y, Higuchi K, Ikeda S: A patient with severe renal amyloidosis associated with an immunoglobulin γ -heavy chain fragment. *Am J Kidney Dis* 43: e23-e28, 2004
 - 2) Wei L, Kawano H, Fu X, Cui D, Ito S, Yamamura K, Ishihara T, Tokuda T, Higuchi K, Maeda S: Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid in vivo. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 11(2): 113-120, 2004
 - 3) Mitsuhashi S, Yazaki M, Tokuda T, Yamamoto K, Ikeda S: MRI analysis on a patient with the V30M mutation is characteristic of leptomeningeal amyloid. *Amyloid: J Protein Folding Disord* 11(4): 265-267, 2004
2. 学会発表
 - 1) 三橋成輝、東城加奈、矢崎正英、徳田隆彦、池田修一: 中枢神経型家族性TTRアミロイドーシスの発症機序の検討. 第44回日本神経学会総会. 東京 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

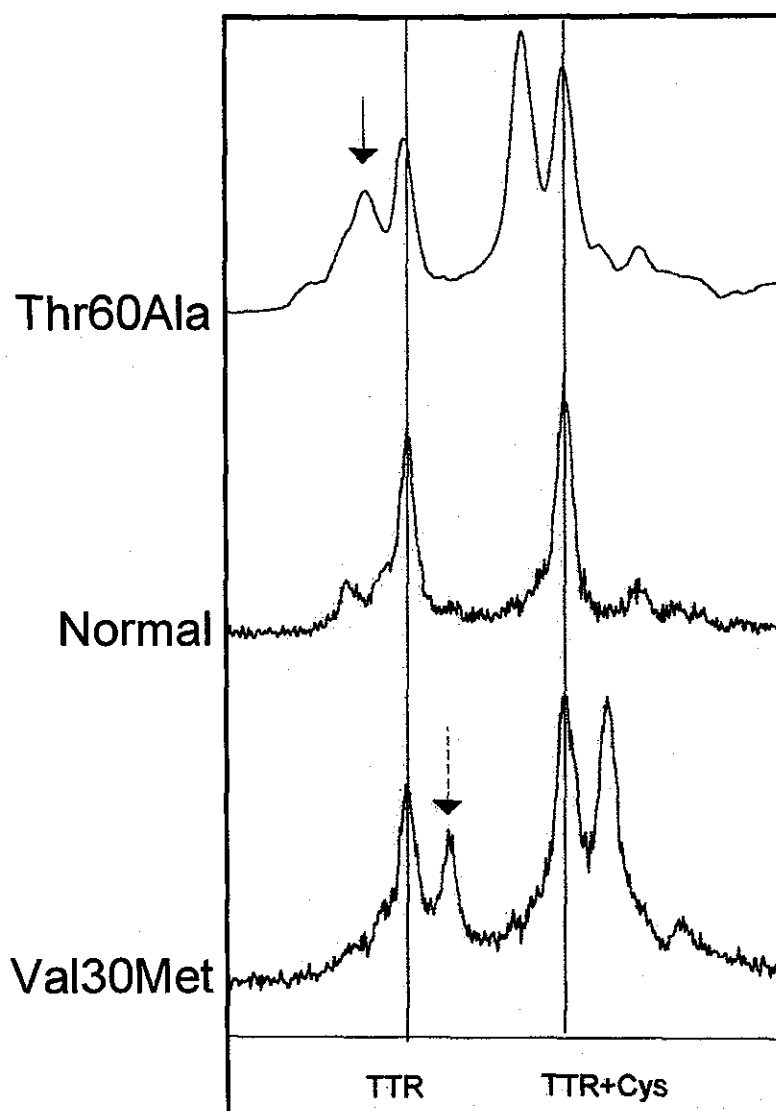


図1 ヒト血清中変異TTRの迅速診断(IP-Mass分析)の例
 変異TTRを有する患者では、正常TTR(実線)のピークとは別に、それぞれの変異TTRの正常TTRとのmass differenceに一致した質量数だけ離れた位置に変異TTRのピークが出現している。

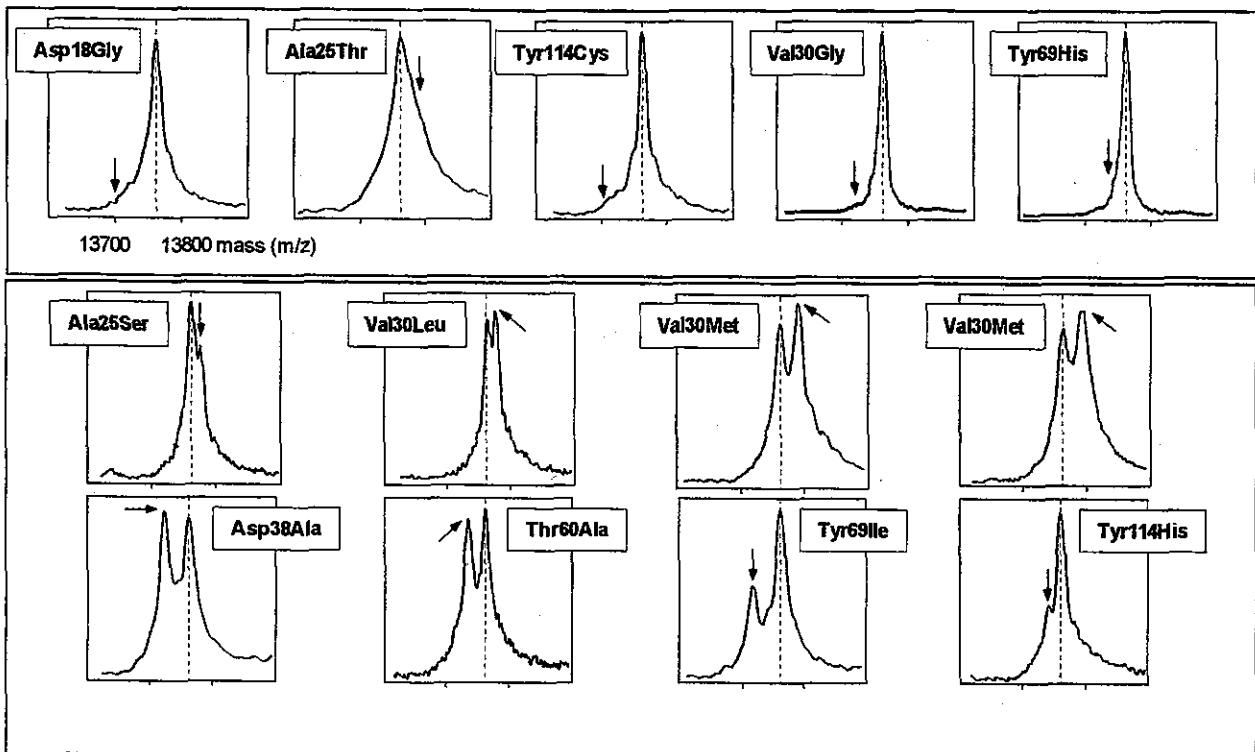


図2 血清中TTRのIP-Mass分析

上段：leptomeningeal-type、中・下段：non-leptomeningeal-type。各矢印は変異TTRのピークまたはそのピークが存在するはずの位置を示す。

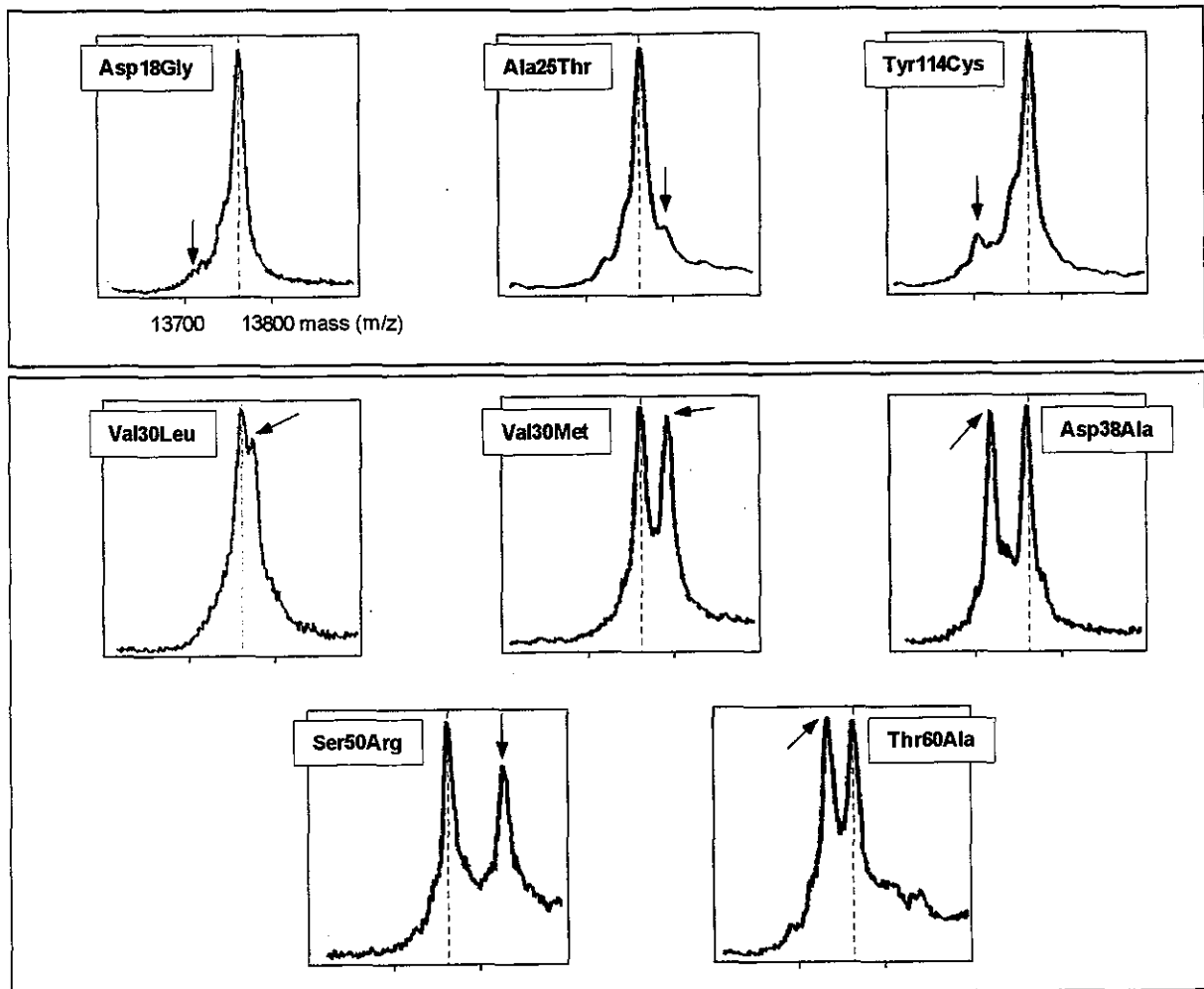


図3 髄液中TTRのIP-Mass分析

上段：leptomeningeal-type、中・下段：non-leptomeningeal-type。各矢印は変異TTRのピークまたはそのピークが存在するはずの位置を示す。

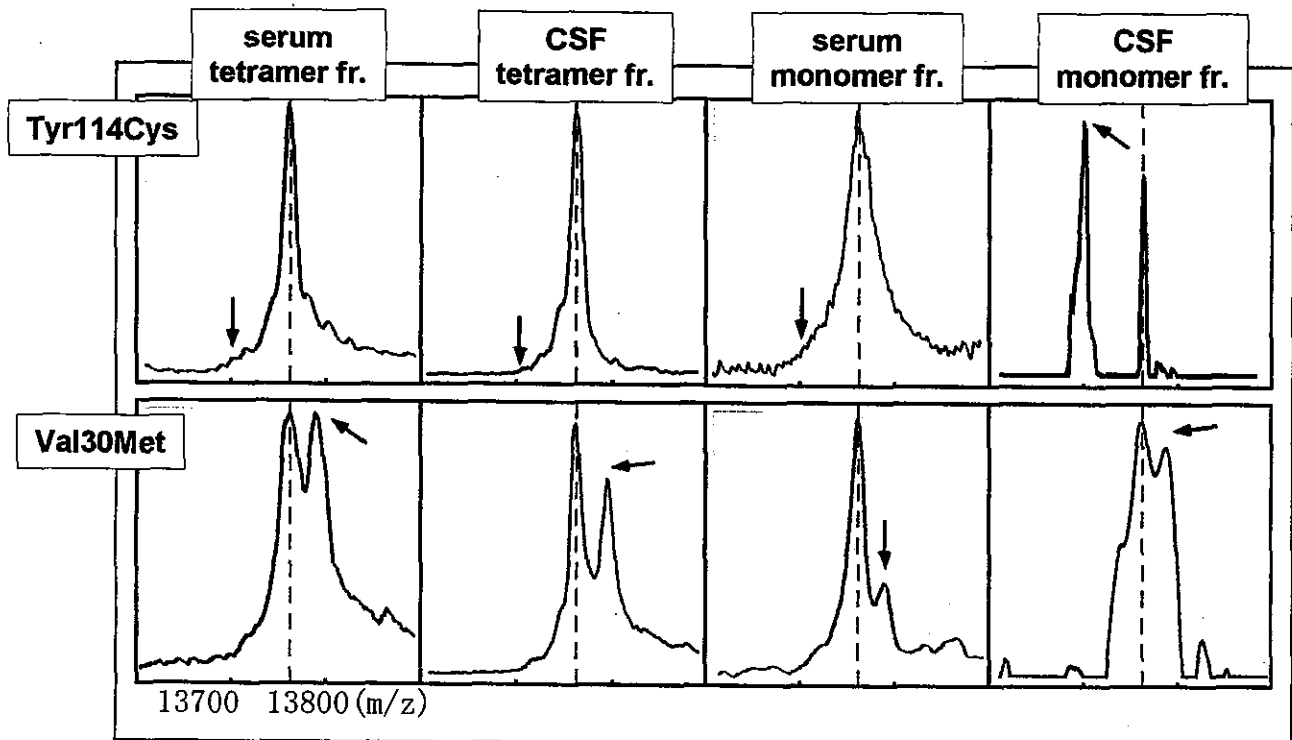


図4 血清および髄液中TTRのtetramerおよびmonomer fractionのIP-Mass分析

上段：Tyr114Cys(leptomeningeal-type)患者由来の試料、下段：Val30Met(non-leptomeningeal-type)患者由来の試料。各矢印は変異TTRのピークまたはそのピークが存在するはずの位置を示す。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

家族性アミロイドポリニューロパチーの新たな診断・治療法の開発

分担研究者 安東由喜雄 熊本大学大学院医学薬学研究部、病態情報解析学分野

研究要旨 FAP の新たな診断・治療法を開発するため、以下の研究を行い、いくつかの新しい知見を得たので、3年間のまとめとして報告する。

【方法】

A. FAP ATTR Tyr114Cys の病態解析: Tyr114Cys 患者に対し、ガドリニウム造影 MRI 検査を行った。又 Tyr114Cys 患者の剖検組織の病理学的検討を行った。

B. Cr³⁺のアミロイド形成抑制作用: 正常ヒト, FAP ATTR V30M ホモ接合体患者血清からそれぞれ抽出した wild type TTR ATTR V30M を用い、酸性条件下で、アミロイド形成実験を行い、TTR の 4 量体の安定性、形成アミロイド量に対する Cr³⁺の影響を検討した。

C. アミロイドーシスの新たな診断法及び診断試薬の開発: Congo red の誘導体のひとつである (trans, trans)-1-bromo-2, 5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) アミロイド, tylbenzene (BSB) を合成し、本剤の in vitro, in vivo における TTR の AA アミロイドに対する親和性を検討するとともに、アミロイド形成阻止剤としての可能性をアミロイド形成実験にて行い、検討した。

D. FAP の肝移植: FAP の肝移植患者を長期フォローし、眼、全身症状、中枢神経症状の変化を検討するとともに、血液生化学データの変化を解析した。

E. FAP の遺伝子治療: FAP の遺伝子治療を試みるために、アテロコラーゲンに包埋した ATTR V30M 及び正常 TTR の遺伝子構造を持つ single-stranded oligonucleotides (SSOs) を Hep G2 による細胞培養系、ATTR V30M のトランスジェニックマウスにそれぞれ投与し、mutant-allele-specific- amplification 法を用い、組み換え率を算定した。

F. FAP の抗体治療: 人工的な ATTR Y78F を合成し、これをアミロイド形成可能なトランスジェニックマウス ATTR V30M (ポルトガルで飼育) に投与し、アミロイド阻止効果を検討した。

G. スウェーデン、ポルトガル、日本における TTR ATTR V30M の患者 DNA を用いて、ハプロタイプ解析を行った。

【結果及び考察】

A. FAP ATTR Tyr114Cys の病態解析: FAP ATTR Tyr114Cys 患者は、高率に脳出血、脳虚血性変化、意識障害などを呈し、これがアミロイドアンギオパチーによるものであることが示された。また、肝移植によって生命予後は保たれるが、目や、特に髄膜に沈着するアミロイドは抑制できないことも明らかになった。

B. Cr³⁺のアミロイド形成抑制作用: FAP ATTR V30M の発症年齢は、地域により違いが見られるが、このような差は、衣食住の環境の違いに起因するのではないかと考えられる。そこで我々は食事等から摂取することができる Cr³⁺ に注目した。Cr³⁺の TTR のアミロイド形成に対する作用を調べたところ、Cr³⁺は、4 量体としての TTR の構造を安定化し、アミロイド線維の形成を抑制することがわかった。その作用部位は T4 の結合部位近傍の 54 番目のグルタミン酸であり、T4 との相乗効果によりアミロイド形成を抑制することも判明した。この部位をリジンに変異させた ATTRGlu54Lys ではこれらの作用は全く認められなかった。Cr³⁺は、食物に多く含まれているだけでなく、ダイエット食品としても購入できる安全性が極めて高い生体必須微量元素であり、終

生服用できる有効な予防薬として有望かもしれない。

C. アミロイドーシスの新たな診断法および診断試薬の開発：Congo red 誘導体である BSB に着目し、FAP を含む全身性アミロイドーシスの組織診断・治療薬としての有用性を検討した。また BSB は lipophilic であり、その構造にベンジジン構造を持たないことから、発癌性などの問題性が少なく、シンチグラフィなどで使用も可能であると考えられる。解析の結果、本剤は検討した全ての全身性アミロイドーシスの組織において、組織沈着アミロイドを Congo red 染色よりもより鋭敏に検出できた。二次性アミロイドーシスを誘起したマウスに BSB を静注したところ、沈着アミロイドに BSB が集積することも判明した。Quartz crystal microbalance を用い、治療薬としての有用性を検討した研究では、BSB は TTR 蛋白自体とは親和性を示さなかったが、FAP 患者から抽出したアミロイドとは強い親和性を示した。そこで本剤がアミロイド表面をマスクし、その形成に阻制的に働く可能性を検討するため、TTR を酸性条件下でインキュベーションし、アミロイド形成実験を行ったところ、BSB を添加した系では、有意にアミロイド形成が抑制されることが判明した。更に投与方法の検討や、誘導体の開発により治療薬として有用となる可能性も考えられる。

D. FAP の肝移植：肝移植に関しては、当施設で経験した 30 例全ての症例で経過良好で、全身症状の進行は止まり、移植を受けた患者のほとんどが社会復帰を果たすまでに回復している。しかし、網膜、脳の脈絡叢から産生される ATTR は抑制することが出来ず、眼や脳髄膜に沈着するアミロイドは阻止できないことも判明した。また、8 名がドナーとなり、ドミノ肝移植が行われ、ドミノ移植された患者では、一部の症例にこれに対する自己抗体が出現し、これらの患者では血中の異型 TTR レベルが低下することが判明した。

E. FAP の遺伝子治療：TTR の主な産生臓器である肝臓、および網膜の異型 TTR 遺伝子を正常化する遺伝子治療研究も行ってきた。正常 TTR 遺伝子を組み込み、BNA 化した oligonucleotide を混合した SSOs を HepG2 細胞の培養に添加す

ると、27%の TTR 遺伝子が組み変わることが判明した。さらに SSOs を FAP のトランスジェニックマウスの肝臓に注入したところ、約 8%の遺伝子組み換えが認められた。また家兎において同様の方法で網膜の TTR 遺伝子の組み換えも検討したところ、有意な組み換えが起こることも判明した。

F. FAP の抗体治療：FAP のアミロイド沈着機構に関しては、ATTR の cryptic epitope が立体構造の変化に伴い、分子表面に露出することがアミロイド形成過程に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。したがって、TTR の代謝動態に影響を与えず FAP 患者に異型 TTR の cryptic epitope のみを認識する抗体を惹起させることができれば、アミロイド沈着を阻止することが可能と考えられる。そこでアミロイド形成過程で生じる cryptic epitope を可溶性状態でも露出するように設計した人工的な点変異 TTR である ATTR Y78P を作成し、これをトランスジェニックマウス ATTR V30M に免疫し、組織のアミロイド沈着への影響を検討した。トランスジェニックマウスへの ATTR Y78P 投与による免疫では、PBS や ATTR V30M の投与より有意に高い ATTR V30M に対する抗体価を惹起することができた。PBS や ATTR V30M を投与したマウス群では、有意な TTR の沈着が消化管に認められたが、ATTR Y78P で免疫したすべてのマウス群では、TTR の沈着が著明に減少していた。また、すでに TTR 沈着が存在する生後 18 ヶ月のマウス群においても、TTR 沈着の軽減が認められた。免疫組織学的解析においては、ATTR Y78P で免疫したマウス群では、TTR が沈着していたと考えられる部位に Mac-1 陽性細胞の浸潤と多数の CD45 陽性細胞を含むリンパ節の増生を認めた。TTR 産生臓器である、肝臓や脾臓、脈絡叢には、種々の細胞浸潤は認められなかった。以上より、ATTR Y78P によって惹起された抗体は、組織沈着アミロイドに特異的な epitope を認識するものと考えられた。

G. FAP のハプロタイプ・スタディー：FAP のハプロタイプは日本、ポルトガル、マジヨルカ島のハプロタイプは似通っているが、スウェーデンのルーツは異なる可能性が示された。また名古屋地区で多く見つかっている一部の患者のハプロ

タイプも、日本の FAP のフォーカスの患者のものとは異なることも明らかになった。スウェーデンの FAP 患者や、名古屋地区の患者において発症年齢、浸透率などが著しく異なることを考えると、TTR の点変異以外に、遺伝子レベルで発症や、臨床病型に影響を与える遺伝子が存在する可能性が示された。

【結論】

FAP ATTR Tyr114Cys の病態解析では、アミロイドアンギオパチーが関与することが示唆された。Cr³⁺は、FAP の進行を遅延させる有効な治療薬の一つとなりうる。BSB は FAP 以外の全身性アミロイドーシスの診断薬として有用であるばかりでなく、治療薬としての可能性も示唆された。肝移植は全身症状の進行を阻止する有用な治療法であるが、眼や髄膜のアミロイド沈着は阻止できない。FAP の遺伝子治療としては SSOs が最も有望であるが、更なる drug delivery system の開発が必要である。FAP の免疫療法は、すでにアミロイド沈着を来たした患者の治療としても有望である可能性が高い。

健康危険情報

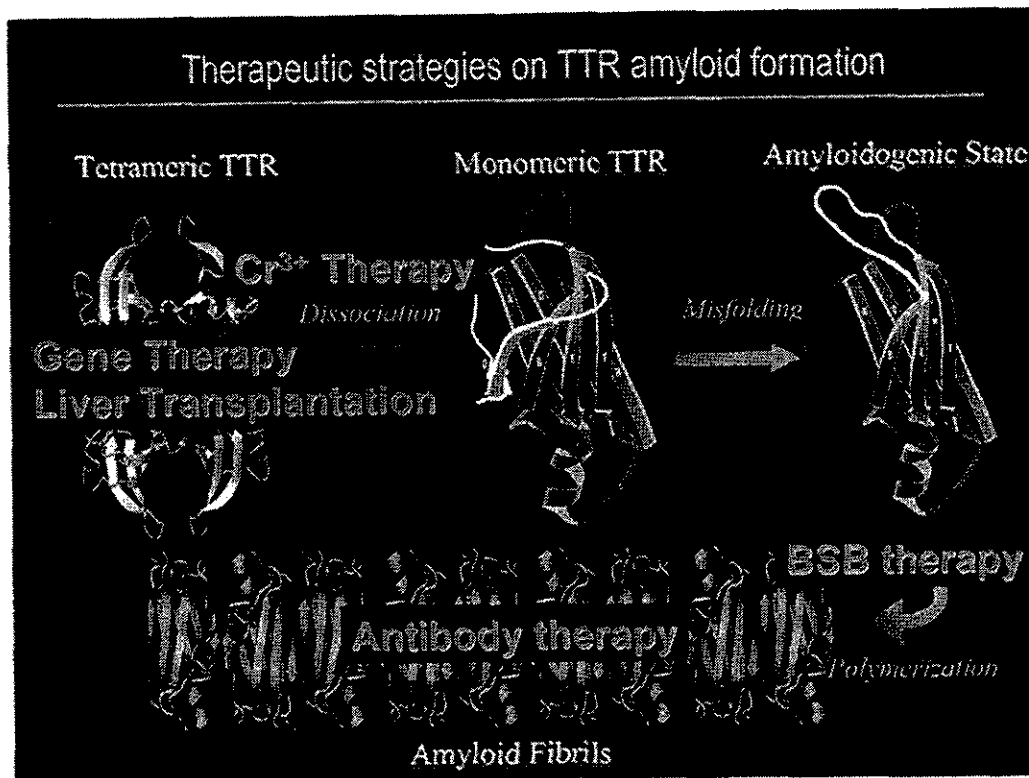
なし

研究発表

1. 論文発表

- Nakamura M, Ando Y, Nagahara S, Sano A, Ochiya T, Maeda S, Kawaji T, Ogawa M, Hirata A, Terazaki H, Haraoka K, Tanihara H, Uchino M, and Yamamura K. Targeted conversion of the transthyretin gene *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*, 11: 838-846, 2004
- Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva M J M, Terazaki H, Suhr O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, and Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet*, 41: e51-e55, 2004
- Koike H, Misu K, Sugiura M, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Mukai E, Ando Y, Ikeda S, and Sobue G. Pathology of early- vs late-onset TTR Met30 familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, 63: 129-138, 2004
- Obayashi K, Ando Y, Nakamura M, Yamashita T, Ueda M, Haraoka K, Terazaki H, and Uchino M. Near-infrared spectrophotometry in assessment of autonomic dysfunction. *Neurology*, 63: 164-166, 2004
- Ando Y, Terazaki H, Nakamura M, Ando E, Haraoka K, Yamashita T, Ueda M, Okabe H, Sasaki Y, Tanihara H, Uchino M, and Inomata Y. A different amyloid formation mechanism: De novo oculoleptomeningeal amyloid deposits after liver transplantation. *Transplantation*, 77: 345-349, 2004
- Ishikawa K, Doh-ura K, Kudo Y, Nishida N, Murakami-Kubo I, Ando Y, Sawada T, and Iwaki T. Amyloid imaging probes are useful for detection of prion plaques and treatment of transmissible spongiform encephalopathies. *J Gen Virol*, 85: 1785-1790, 2004
- Yamashita T, Ando Y, Nakamura M, Obayashi K, Terazaki H, Haraoka K, Sun X, Ueda M, Uchino M. Inhibitory effect of α -tocopherol on methylmercury-induced oxidative stress. *Environ Health Prev Med*, 9: 111-117, 2004
- Kitajima M, Horogi Y, Yamura K, Ikushima I, Hayashida Y, Ando Y, Uchino M, Yamashita Y. Familial amyloid polyneuropathy: Hypertrophy of ligaments supporting the spinal cord. *Am J Neuroradiol*, 25: 1599-1602, 2004
- Yamashita T, Ando Y, Katsuragi S, Nakamura M, Obayashi K, Haraoka K, Ueda M, Uchino M. Familial amyloid angiopathy with muscular amyloid angiopathy. *Muscle Nerve*, 31: 41-45, 2004
- Motomiya Y, Ando Y, Haraoka K, Sun X, Morita H, Amano I, Uchimura T, and Maruyama I. Studies on unfolded

- beta2-microglobulin at C-terminal in dialysis related amyloidosis. *Kidney Int*, 67:314-320, 2005
11. Obayashi K, Hanyu O, Miida T, Ando Y, Nakamura M, Zhu Y, and Okada M. Circadian rhythm of protein C in human plasma: Useful marker of autonomic function in liver. *Clin Auton Res*, 2004 in press.
 12. Araki-Sasaki K, Ando Y, Nakamura M, Kitagawa K, Ikemizu S, Kawaji T, Yamashita T, Ueda M, Hirano K, Yamada M, Matsumoto K, Kinoshita S, Tanihara H. Lactoferrin Glu561Asp Facilitates Amyloid Formation in the Cornea. *Brit J Ophthalmol* 2005 in press.
 13. Nakamura M, and Ando Y. Application of gene therapy for FAP. *Expert Opin Ther Pat*, 10:1621-1627, 2004.
 14. Ando Y, Nakamura M, and Araki S. Transthyretin related familial amyloidotic polyneuropathy. *Arch Neurol*, 2005 in press
 15. Nakamura M, Ando Y, Sasada K, Haraoka K, Ueda M, Okabe H, and Yoshihiro Motomiya Y. Role of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) in patients under maintenance hemodialysis. *Nephron* 2005 in press.
2. 学会発表
1. Ando Y. Near-infrared spectrophotometry of finger venules in assessment of autonomic dysfunction on Neurologic disorders. First Joint Meeting of the European Federation of Autonomic Societies & American Autonomic Society, Amsterdam, Neitherland, 2004
 2. 安東由喜雄 FAP 研究の最前線, 第 15 回飛鳥フォーラム, 奈良, 2004
 3. 安東由喜雄 トランスサイレチンの栄養アセスメント蛋白としての重要性. 第 6 回臨床検査標準化研修会, 熊本, 2004
 4. 安東由喜雄. NST と栄養アセスメント蛋白. 第 16 回薬学セミナー, 熊本, 2004
 5. 安東由喜雄. 何故今 NST にトランスサイレチンなのか. 第 51 回日本臨床検査医学会総会イブニングセミナー, 東京, 2004
 6. 安東由喜雄. アミロイドーシスと炎症. 第 3 回 RAND (好中球) 研究会, 京都, 2004
 7. 安東由喜雄. 「癌治療・研究におけるジレンマ」—遺伝子診断は役に立つのか—. 科学技術振興調整費, 村上班会議, 特別講演, 東京, 2004
 8. 安東由喜雄. アミロイドーシスと炎症. 第 23 回日本臨床化学会夏季セミナーシンポジウム「炎症と臨床化学」, 鹿児島, 2004
 9. 安東由喜雄. アミロイドーシスと肝臓. シンポジウム「肝臓疾患」第 36 回日本電子顕微鏡学会, 熊本, 2004
 10. 安東由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチーの新しい治療法の開発. 第 46 回日本神経学会総会シンポジウム「難治性ニューロパチーの新しい治療戦略」, 鹿児島, 2005 予定
 11. 安東由喜雄. トランスサイレチンの遺伝子変異と免疫反応. 第 15 回日本臨床化学会九州支部会総会, 久留米, 2005
 12. 安東由喜雄. 「血清蛋白とアミロイドーシス」. 血液疾患のトピックスと検査医学. 第 6 回日本検査血液学会, 長崎, 2005
- 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
 - (1) 部位特異的遺伝子変換促進剤及び遺伝子治療剤
 - (2) アミロイドーシスの予防及び治療のための医薬
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

マウスモデルを用いたアミロイドーシス発症機構の解明

分担研究者 樋口京一 信州大学医学研究科加齢生物学

共同研究者 澤下仁子、付笑影、Zhang Huanyu、嚴景民、是永龍巳、葛鳳華、Zhang Beiru、
森政之 信州大学医学研究科加齢生物学

研究要旨 現在 25 種以上報告されている各種のアミロイドーシスの発症機構を解明し、その治療法や予防法を開発するためには適切なモデルマウスを用いることが必要不可欠である。マウス反応性 (AA) アミロイドーシス (硝酸銀の皮下投与による急性炎症) やマウス老化(AApoAII)アミロイドーシスを用いて、環境から体内に侵入したアミロイド線維が、種(seed)となってアミロイド線維の伸長を促進し、アミロイドーシスを促進・誘発する「アミロイド線維による伝播」機構についての解析を行った。ウシ、ヒト、マウスの AA 線維や他のアミロイド線維の硝酸銀との同時投与は AA アミロイドの沈着を誘発し、異種アミロイド線維による伝播の可能性を示唆した。AApoAII アミロイドーシスではモデルマウスを用いたアミロイド線維の伝播力を推定するシステムを開発し、アミロイド線維による伝播には、線維構造が重要であることが明らかになった。マウス apoA-II の合成部分ペプチドを用いた解析により、アミロイド線維形成には β シート構造に富んだ C 末端部分と、無構造な N 末端部分が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

モデルマウスを用いて、アミロイドーシスの発症を調節する要因を解明し、治療・予防法の開発を目指すのが研究目的である。特にマウス AApoAII アミロイドーシスで発見されたアミロイド線維による伝播機構の解明という重要課題に焦点を絞り、1)発症を促進する因子の解明、2)アミロイド線維の伝播力失効処置の解析、3)アミロイド線維形成機構の解明について研究を行った。

B. 研究方法

1) マウス AA アミロイドーシスの発症を促進する要因(amyloid enhancing factor: AEF)の解析 : 高齢牛 (ホルスタイン) から AA アミロイド線維を抽出し、1N NaOH で変性した後、ウサギに投与し抗血清を作成した。C57BL/6 マウスに 1.0% 硝酸銀水溶液の皮下投与によって炎症を惹起すると同時に各種アミロイド線維 (ヒト AA, ATTR (Met30Val) , AL、マウス AA, マウス AApoAII 等) を尾静脈に投与し、10 日後に屠殺して全身

の AA 沈着を調べた (AEF 活性の測定)。

また硝酸銀水溶液を皮下投与し急性炎症を起こしたマウスの好中球からアミロイド線維分画 (水抽出分画) を抽出し、上記と同様の方法で AEF 活性を調べた。さらに Mrp14 抗体による吸収後の AEF 活性の減少を解析した。

生体での AApoAII と AA アミロイド線維の相互作用を解析するために、SAMRIC マウスに AApoAII アミロイド線維を投与し、アミロイド沈着を誘発後 (2 ヶ月後)、硝酸銀水溶液を投与し、AA アミロイドの沈着を調べた。

2) アミロイド線維の AApoAII アミロイドーシス伝播力の測定 : SAMRIC マウスへ段階希釈した AApoAII アミロイド線維を投与して、2 ヶ月後のアミロイド沈着を調べて、アミロイド線維量とアミロイド沈着程度との相関を調べた。またアミロイド線維の伝播を抑制する物理/化学的処理や薬剤の解析を行った。

3) 合成部分ペプチドを用いた AApoAII アミロイド線維形成機構の解析 : AApoAII の線維形成機構を解明するために、ApoA-II の合成部分ペ

プチドを用いて試験管内での線維形成反応を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はほとんどマウスを使用した研究であり実験に供するマウスは信州大学動物実験委員会へ実験計画を提出し、承認を得た後に、信州大学医学部動物実験の指針に従い飼育し、苦痛が最小限となるように使用及び屠殺するように留意した。

アミロイド線維による伝播に関しては、ヒトや正常マウスへの伝播/発症の危険は無いと考えられるが、アミロイド線維を扱う際は、手袋とマスクを着用し、使用した器具は焼却するか、1N NaOH 内で加圧滅菌あるいは、2N NaOH に 2 時間以上浸して処理することになっている。

C. 研究結果

1) 色々なアミロイド線維の投与はAAアミロイド線維の沈着を誘発した。その沈着程度はマウスAAアミロイド線維が最も高く、以下ヒトAA、ウシAA、ヒトAL、マウスAApoAII、 α シヌクレイン、酵母GroES、ヒトATTRの順番であった。各アミロイド線維にはアミロイド線維に共通した構造が存在し、seedとして作用する(Cross-seeding)ことが示唆された(図1)。

急性炎症を引き起したマウス好中球のAEF(AEF-N)に対する抗体の主要な抗原物質はMRP-14蛋白質である(平成14年度、アミロイドーシス調査研究班報告書)。AEF-Nは、アミロイド線維(水抽出)分画に濃縮されることが明らかになった。またこの分画をMRP-14抗体で吸収するとAEF活性は減少した。

あらかじめAApoAIIが沈着しているマウスに硝酸銀を投与すると、AApoAII沈着場所に一致して、AAの沈着が誘導される事が示された。これらの事実より、生体でも異種アミロイド線維間の相互作用が発症を調節することが示唆された。

2) 10^{-10} - $10^2 \mu\text{g}$ のAApoAIIアミロイド線維をSAMR1Cマウスへ投与し、アミロイド沈着程度(Amyloid Index; AI)を調べた結果、 10^{-2} - $10^2 \mu\text{g}$ では投与量の対数に比例してAIが増加した。この領域を利用してアミロイド線維 $1 \mu\text{g}$ を投与し、

伝播力を測定した(図2)。 10^{-7} - $10^{-2} \mu\text{g}$ 投与ではアミロイド沈着マウスが部分的に観察され、 $10^{-8} \mu\text{g}$ 以下の投与では沈着マウスは認められなかった。アミロイド線維の伝播力の完全失活にはグアニジン塩酸、蟻酸、NaOH処理が、部分的失活には尿素、オートクレーブ、数種類の抗生物質などが有効であった。処理後のアミロイド線維をチオフラビンT法によって測定した線維量、電子顕微鏡的観察による線維の存在量と伝播の強さは良く相関し、伝播にはアミロイド線維の存在が重要であることが示された。

3) 合成部分ペプチドを用いて試験管内線維形成反応の解析を行った結果、N-末端と、C-末端の部分ペプチドが、同量存在することが線維形成に重要であることが明らかになった。現在pH. 2.5の条件下で核形成依存性重合反応(nucleation dependent polymerization)を示し、形成された線維は伝播性を示したがその伝播力は、天然線維と比較するとはるかに低かった。

D. 考察

これまでに異種のアミロイド線維が、AApoAIIアミロイドーシスの発症を促進することを示してきた。今回マウスAAアミロイドーシスでも異種・多種のアミロイド線維がアミロイド沈着を促進/誘発することが明らかになった。誘発の程度はアミノ酸一次構造が等しいマウスAAアミロイド線維が最も強く、ヒト、ウシAA、さらにマウスAApoAIIと一次構造が離れるにつれて弱くなった。マウスでは比較的大量のアミロイド線維の投与がアミロイド沈着を誘発したが、ヒトのAAアミロイドーシスでも環境からの微量のアミロイド線維の侵襲によりアミロイドーシスの発症が促進される可能性があるのか?さらなる検討が必要である。

どのような構造により、伝播が引き起されるのかは明らかになっていない。今回、様々な科学的、物理的な処理を行ったアミロイド線維のチオフラビンT法による線維量、電子顕微鏡での線維形態の観察、マウスを用いた伝播力の測定は、良く一致していた。この結果は伝播の主体はmatureなアミロイド線維構造であることを示唆する。

従来血清高密度タンパク質(HDL)から精製し

たマウス apoA-II(78 アミノ酸)を用いて天然の AApoAII アミロイド線維を核として試験管内でアミロイド伸長が起ることを示してきた。より詳細な線維形成機構と伝播機構を解析するために、部分ペプチドを合成して、線維形成の解析を行った。どの部分のペプチドでも単独では線維形成が進行せず、 β シート構造に富む C 末端に近い部分(AA 48-65)と自由な構造を取ると考えられている N 末端部分 (AA1-18) が必要であるというユニークなモデルが明らかになった。今後、中性領域での線維形成機構解明や、効率良い伝播に必要な要素の探索、伝播経路の解明に応用できるモデル系であると考えている。

E. 結論

マウス AApoAII と AA ではプリオンに類似した伝播の存在が示唆された。今後はヒトアミロイドーシス発症における「伝播」の役割解明が重要である。

F. 健康危険情報

マウス AA アミロイドーシスでは異種のアミロイド線維投与でアミロイドーシスの発症促進が観察された。ヒト AA アミロイドーシスでも同様なことが起りうるのか？ 慎重な検討が必要と考える。

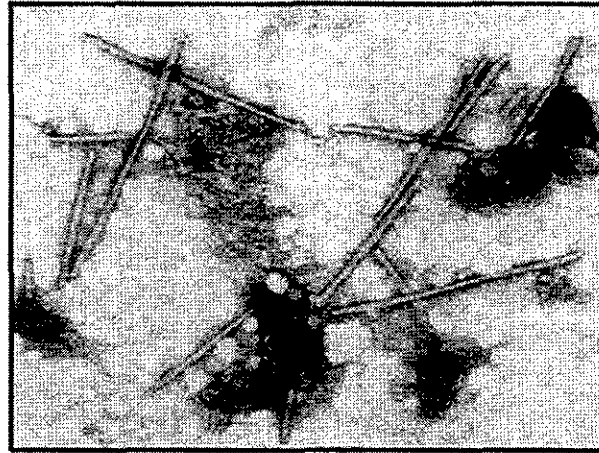
G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fu X, Korenaga T, Xing Y, Fu L, Guo Z, Matsushita T, Hosokawa M, Naiki H, Baba S, Kawata Y, Ikeda S, Ishihara T, Mori M, Higuchi K.: Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogeneous amyloid fibrils. FEBS Letter 563: 179-184, 2004
- 2) Korenaga T, Fu X, Xing Y, Matsushita T, Kuramoto K, Syumiya S, Hasegawa Z, Naiki H, Ueno M, Ishihara T, Hosokawa M, Mori M, Higuchi K.: Tissue Distribution, Biochemical Properties and Transmission of Mouse Type A AApoAII Amyloid Fibrils. Am J Pathol. 164: 1597-1606, 2004
- 3) Yazaki M, Fushimi T, Tokuda T, Kametani F, Yamamoto K, Matsuda M, Shimojo H, Hoshii Y, Higuchi K, Ikeda S.: A patient with severe renal amyloidosis associated with an immunoglobulin gamma-heavy chain fragment. Am J Kidney Dis. 43: e23-28. 2004
- 4) Wei L, Kawano H, Fu X, Cui D, Ito S, Yamamura K, Ishihara T, Tokuda T, Higuchi K, Maeda S.: Deposition of transthyretin amyloid is not accelerated by the same amyloid in vivo. Amyloid 11: 113-120. 2004
- 5) 樋口京一、森 政之：SAM(老化促進モデルマウス)。『モデル動物の作成と維持』(森脇和郎、山村研一、米川博通編) pp929-937, エル・アイ・シー (東京) 2004
- 6) 樋口京一：アミロイドーシスの伝播機構。『細胞における蛋白質の一生』(小椋 光、遠藤斗志也、森 正敬、吉田賢右編) pp1101-1104, 蛋白質核酸酵素増刊 共立出版 2004
- 7) Higuchi K, Xing Y, Fu X, Korenaga T, Guo Z, Nakamura A, Mori M.: Mouse senile amyloidosis in the SAM model. In The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence (Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds). pp35-40. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 2004
- 8) Fu X, Korenaga T, Xing Y, Fu L, Guo Z, Matsushita T, Hosokawa M, Naiki H, Mori M, Higuchi K.: Induction of AApoAII and AA amyloidosis by the injections of various amyloid fibrils. In The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence (Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds). pp383-386. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 2004
- 9) Umezawa M, Okumura H, Hosokawa M, Takeda T, Higuchi K. Effects of dietary fats on senile amyloidosis in SAMP1 mice. In The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): an animal model of senescence (Nomura Y, Takeda T, Okuma Y eds). pp427-431. Elsevier BV Amsterdam, The Netherlands. 2004
- 10) 樋口京一：マウス老化アミロイドーシス。アミロイドーシスの基礎と臨床。(池田修一編) 金原出版 (東京) 印刷中 2005

- 11) 樋口京一、付笑影：アミロイドーシスと伝播。
アミロイドーシスの基礎と臨床（池田修一編）
金原出版（東京）印刷中 2005
- 12) 樋口京一：アミロイドーシスと老化、日本ア
フェレシス学会雑誌 23(2): 143-150. 2004
- 13) 樋口京一、付笑影：老化アミロイドーシス、
基礎老化研究 28(4): 7-13. 2004
2. 学会発表
- 1) Sawashita J, Zhang H, Korenaga T, Higuchi K.:
The inhibitive effects of extrasomatic treatments
and medical reagents to the transmission of
amyloid fibril on mouse senile amyloidosis. Xth
International Symposium on Amyloidosis. April
18-22, 2004 Tours, France
- 2) Korenaga T, Fu X, Mori M, Sawashita J, Naiki H,
Matsushita T, Higuchi K.: Transmission of mouse
AApoAII amyloidosis from mother to pups. Xth
International Symposium on Amyloidosis. April
18-22, 2004 Tours, France
- 3) Higuchi K.: Transmission of mouse senile
amyloidosis. 1st Italian-Japanese workshop,
Dialysis-related amyloidosis: from molecular
mechanisms to therapies. December 9-13, 2004
Pavia. Italy
- 4) Higuchi K, Fu X, Korenaga T, Sawashita J, Mori
M.: Genetics and transmission of mouse systemic
amyloidosis. International Symposium on
Amyloidosis; Genetics, Biochemistry, Pathology
and Clinical Studies/ February, 10-11, 2005,
Kumamoto, Japan
- 5) 樋口京一：マウスアミロイドーシス(AApoAII)
を用いたアプローチ。シンポジウム「タンパ
ク質のコンフォメーション異常とフォールデ
ィング病」日本農芸化学学会 2004 年度大会
(2004.3.31 広島)
- 6) 樋口京一：老化アミロイドーシスモデルマウ
スの開発と応用。ワークショップ「老化病態
研究のための実験モデル」第93回日本病理学
会総会 (2004.6.11 札幌)
- 7) 樋口京一：アミロイドーシスの伝播機構。熊
本大学大学院特別セミナー 2004.11.17
- 8) 澤下仁子、Zhang Huanyu, 是永龍巳、Fu
Xiaying, Yan Jingmin, 森政之、樋口京一：外来
性アミロイド線維によるマウス老化アミロイ
ドーシス発症促進に対する各種薬剤の効果。
第93回日本病理学会総会 (2004.6.9 札幌)
- 9) 張桓宇、是永龍巳、付笑影、森政之、樋口京
一、澤下仁子。マウス老化アミロイド線維の
伝播防止処理効果に関する検討。第9回臨床
ストレス蛋白質研究会。(2004.11.3 秋田)
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

A



B

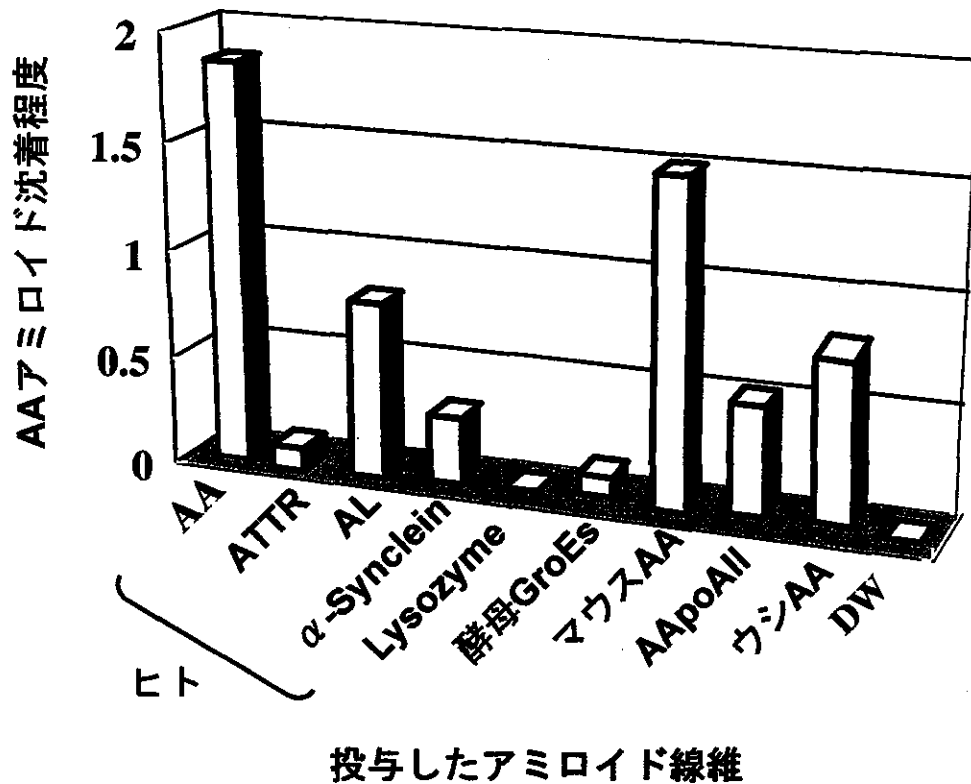


図1 異種のアミロイド線維によるマウスAAアミロイド沈着の促進(伝播)。A. 高齢牛より抽出したAAアミロイド線維の電子顕微鏡像。B. 色々なアミロイド線維投与によるAAアミロイドーシス誘発。アミロイド沈着程度はアミロイド指数(AI)で表す。

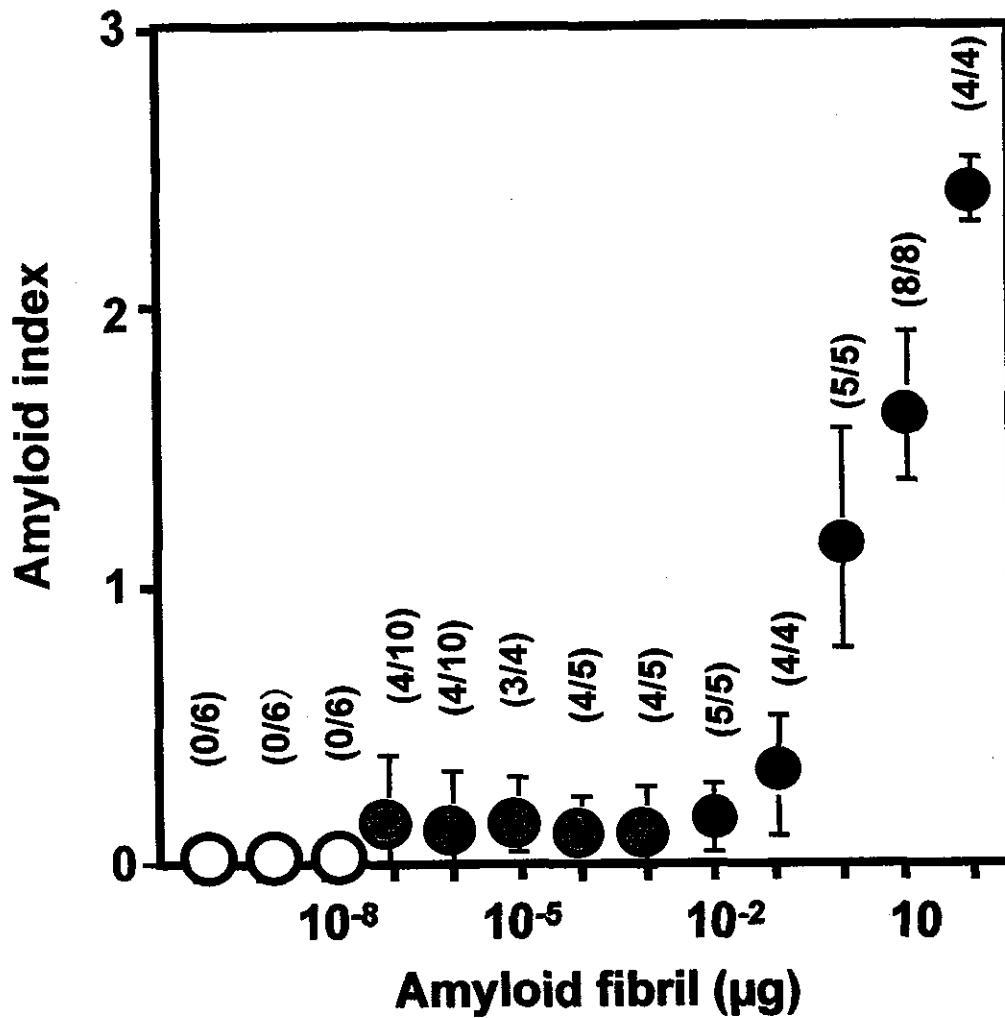


図2 AApoAllアミロイド線維の投与量とアミロイド沈着との関連。AApoAllアミロイド線維を段階希釈して2ヶ月齢のSAMR1Cマウスに投与し、2ヶ月後のアミロイド沈着程度を調べた。 10^{-10} - 10^2 μg (●) では投与量の対数とアミロイド沈着量は比例する。

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

A β の高感度分析法を用いた γ セクレターゼによるAPP切断部位の検討

研究協力者 亀谷富由樹 東京都精神医学総合研究所分子神経生物
 共同研究者 池田修一 信州大学医学部第三内科

研究要旨 β アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、 α セクレターゼまたは β セクレターゼ切断部位において切断され、C端側断片(C83またはC99)を産生する。このC端側断片からは、さらに γ セクレターゼによる切断によって、アミロイド β タンパク質(A β)またはp3と細胞内断(AICD)が産生される。最近、 γ セクレターゼによって生じたAICDのN末端のアミノ酸配列が解析され、本来考えられていた切断部位より7から9残基C末側で切断されていることが明らかにされた(ε 切断部位)。これまでのところ、 γ および ε 切断部位の関係については不明である。そこで切断部位の詳細を解析するため、培養細胞の膜分画を用いてAICDの産生を解析するとともに、分泌されたA β およびその誘導体を網羅的高感度分析法を用いて解析した。そして、A β 産生とAICD産生は別々に制御されていること、および、ABC末側の切断は先に ε 切断が起こり、その後段階的に切断が起こり、 γ 部位に至ることを明らかにした。

A. 研究目的

β アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、 α セクレターゼまたは β セクレターゼ切断部位において切断され、C端側断片(C83またはC99)を産生する。このC端側断片からは、さらに γ セクレターゼによる切断によって、アミロイド β タンパク質(A β)またはp3と細胞内断(AICD)が産生される。最近、 γ セクレターゼによって生じたAICDのN末端のアミノ酸配列が解析され、本来考えられていた切断部位より7から9残基C末側で切断されていることが明らかにされた(ε 切断部位)。これまでのところ、 γ および ε 切断部位の関係については不明である。そこで切断部位の詳細を解析するため、A β の網羅的高感度分析法を用いて、 γ および ε 切断部位の関係を解析した。

B. 研究方法

APPおよびそのC端側断片(C83およびC99)を発現させたCOS-1細胞の膜分画を調製し、in vitroでのAICD産生をAPPC末抗体R37を用いて分析した。また、培養上清中に分泌されたA β およびその誘導体のC末切断部位の詳細を抗A β 抗体E50による免疫沈降と液体クロマトグラフィ質量分析器(LC/MS/MS)を組み合わせ、網羅的に、

高感度に分析した。

C. 研究結果

AICDはAPPおよびそのC端断片を発現した細胞において産生された。反応開始時点でのCTF α の量に応じて、AICDが産生され、AICDの産生増加に伴って、CTF α が減少している傾向がみられた(Figure 1)。一方、 β セクレターゼであるBACE1との共発現をおこなった細胞では、CTF β は増加し、A β も増加したが、CTF α は減少し、AICDの産生も減少した(Figure 1)。また、C99を発現させた細胞ではC83を発現させた細胞に比べ、AICD産生量は減少した(Figure 2)。

C83およびC99を発現させたCOS-1細胞の培養上清中のA β およびその誘導体の網羅的な解析を行ったところ、N末端が、A β 残基1-23で始まり、C末端がA β 残基33-52で終わる種々のA β ペプチドが分泌されていることを見出した(Table 1)。これらのペプチドのなかで、C末端がA β 残基49-52(ε 切断部位)で切断されたと考えられるペプチド(A β 16-52、19-52、21-49、22-50、23-50)は、すべてN末端領域の1-15を欠いており、 α 切断によるC83断片由来の産生物と考えられた(Table 1)。また、これらの結果は ε 切断の後に段階的に切断が

起き、 γ 切断に至ることを示していた (Figure 3)。さらに、ヒト脳中の可溶A β およびその誘導体の解析結果からも同様の結果を得た (Table 1)。

D. 考察

ϵ 切断によって産生される AICD が C83 の産生量に依存していることが明らかとなった。このことは、A β 産生が C99 に依存していることから、A β 産生と AICD 産生との間に関連性が無いこと示している。また、培養上清中に分泌された A β およびその誘導体の網羅的な解析において、 ϵ 切断によって産生され、そのまま分泌されたと考えられた long A β すべてが N 末部の 1-15 を欠いており、これらは α 切断によって生じた C83 由来であると考えられたことも上記の結果を支持している。

以上のことは、APP の C83 断片と C99 断片が別々の代謝機序によって代謝されている可能性を示唆するものである。

E. 結論

(1) A β 産生と AICD 産生は別々に制御されている。(2) A β C 末側の切断は先に ϵ 切断が起こり、その後段階的に切断が起こり、 γ 部位に至る。(3) 免疫沈降と LC/MS/MS の組み合わせは A β の解析において非常に有効な分析方法である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotsu N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, Ihara Y. Longer forms of amyloid beta protein: Implications for the mechanism of intramembrane cleavage by *gamma*-secretase. *J Neurosci* 25: 436-445, 2005
- 2) Kametani F. Secretion of long Abeta-related peptides processed at epsilon-cleavage site is dependent on the alpha-secretase pre-cutting. *FEBS Lett* 570:73-76, 2004

- 3) Kametani F, Usami M, Tanaka K, Kume H, Mori H. Mutant presenilin (A260V) affects Rab8 in PC12D cell. *Neurochem Int* 44, 313-320, 2004
- 4) Kume H, Maruyama K, Kametani F. Intracellular domain generation of amyloid precursor protein by epsilon-cleavage depends on C-terminal fragment by alpha-secretase cleavage. *Int J Mol Med* 13, 121-125, 2004
- 5) Yazaki M, Fushimi T, Tokuda T, Kametani F, Yamamoto K, Matsuda M, Shimojo H, Hoshii Y, Higuchi K, Ikeda S. A patient with severe renal amyloidosis associated with an immunoglobulin gamma-heavy chain fragment. *Am J Kidney Dis* 43:e23-28, 2004
- 6) Tojo K, Tokuda T, Yazaki M, Oide T, Nakamura A, Mitsuhashi S, Kaneko K, Maruyama K, Kametani F, Higuchi K, Ikeda SI. Paraneoplastic sensorimotor neuropathy and encephalopathy associated with anti-alpha-enolase antibody in a case of gastric adenocarcinoma. *Eur Neurol* 51:231-233, 2004
- 7) Kume H, Sekijima Y, Maruyama K, Kametani F. gamma-Secretase can cleave amyloid precursor protein fragments independent of alpha- and beta- secretase pre-cutting. *Int J Mol Med* 12, 57-60, 2003

2. 学会発表

- 1) Kametani F: Sensitive analysis of Abeta related peptides with immunoprecipitation and liquid chromatography ion trap mass spectrometer. 第47回日本神経化学学会大会、大阪、9月21-23日、2004.
- 2) Yoshimura K, Kametani F, Yamamuro Y, Fujimaki K, Tanaka K, Sakurai Y, Akita M, Nomura M, Asou H: The monoclonal antibody, 12F7, recognizes antigens in both oligodendrocytes and astrocytes in vitro. 第47回日本神経化学学会大会、大阪、9月21-23日、2004.
- 3) 亀谷富由樹: ϵ 部位で切断された long A β 関連ペプチドの分泌. 第23回日本痴呆学会、東京、9月29-30日、2004.